

***In vitro* action of the BioR and BioR^{Zn} preparations on the clinical and functional activity of T lymphocytes in patients with adverse reactions to anti-tuberculosis preparations**

*S. Ghinda¹, V. Rudic², T. Chiriac², V. Chiroasca¹, A. Brumaru¹

¹ Ch. Draganiuc Institute of Phthisiopneumology, Chisinau, the Republic of Moldova

² Institute of Microbiology and Biotehnology, Academy of Science, Chisinau, the Republic of Moldova

*Corresponding author: ghinda-sergei@mail.ru. Article received July 17, 2013; accepted September 15, 2013

Abstract

The purpose of our research is to study the *in vitro* action of the drugs BioR and BioR^{Zn} (a complex of essential bioactive zinc components in spirulina) on the clinical picture and full functional activity of T-lymphocytes, depending on the adverse effects of antituberculosis drugs. For processing the materials the operating methods of statistical estimation, including the Student's criterion, Windows 2007 software, etc. have been used. The study has included 110 patients of both sexes with various forms of pulmonary tuberculosis. Depending on the reaction to anti-tuberculosis preparations, the patients were divided into three groups: 1) allergic reaction (AR) – 37 patients, 2) toxic-allergic reactions (TAR) – 49 patients and 3) the patients with toxic reaction (TR) – 24 people. To characterize the state of proliferation activity of T lymphocytes the reaction of blast transformation of lymphocytes with phytohaemagglutinin has been used. The patients with allergic, toxic-allergic and toxic reactions on antituberculosis preparations have demonstrated clinical and laboratory differences, that confirm the severe disease progression in the patients with toxic reactions and less severe disease progression in the patients with allergic reactions. BioR preparations and, especially, BioR^{Zn} present the immunomodulatory action of T lymphocytes "in vitro". The lower the level of proliferation activity of T lymphocytes in patients is, the higher the immunomodulatory activity of preparations BioR and, in particular, BioR^{Zn} in the process of proliferation of T lymphocytes and vice versa is.

Key words: tuberculosis, T lymphocytes, anti-tuberculosis chemotherapy.

Acțiunea *in vitro* a preparatelor BioR și BioR^{Zn} asupra tabloului clinic și activității funcționale a limfocitelor T la bolnavii cu reacții adverse la preparatele antituberculoase

Introducere

Sunt cunoscute efectele negative ale polichimioterapiei asupra imunității bolnavilor de tuberculoză. Nivelul de alergie și toxicitatea, rezultate din acțiunea chimioterapelor pot determina mecanismele patogenetice ale dezvoltării deficienței imunitare secundare care, la rândul său, poate modifica reactivitatea organismului și crea premise pentru diminuarea rezistenței lui.

În ultimii ani, un interes deosebit se acordă elucidării rolului microelementelor și diverșilor compuși bioactivi în reglarea disfuncțiilor reactivității imune a organismului. Zincul este unul din microelementele cu rol determinant în realizarea funcției imunitare a organismului, niveluri optime ale căruia asigură intensificarea activității subpopulațiilor de limfocite T, a rezistenței naturale a organismului, determină comutarea sintezei anticorpilor la producerea de celule imune, precum și realizarea efectelor hiposensibilizante și antianafilactice [1].

Dintre principiile bioactive cu proprietăți imunomodulatoare se evidențiază cele extrase din diverse surse vegetale. Astfel, preparatele elaborate pe baza principiilor active, extrase dintr-o sursă vegetală considerată non-convențională - cianobacteria *Spirulina platensis* prezintă o acțiune reglatoare semnificativă asupra sistemului imunitar și rezistenței naturale a organismului [2, 3, 4].

În contextul celor expuse, scopul cercetărilor noastre constă în studierea *in vitro* a acțiunii preparatelor BioR și BioR^{Zn} (complex de principii bioactive zinccomponente din spirulină) asupra tabloului clinic, activității funcționale a limfocitelor T

în funcție de manifestările efectelor adverse ale preparatelor antituberculoase.

Material și metode

Studiul a inclus 110 bolnavi de sex masculin și feminin cu diverse forme ale tuberculozei pulmonare. În funcție de reacțiile la preparatele antituberculoase, bolnavii au fost divizați în trei grupuri: 1) cu reacții alergice (RA) – (37 de bolnavi); 2) cu reacții toxico-alergice (RTA) – (49 de bolnavi); 3) cu reacții toxice (RT) – (24 de bolnavi). Pentru caracterizarea stării activității de proliferare a limfocitelor T a fost utilizată reacția de transformare blastică a limfocitelor cu fitohemaglutinină (TTBL+PHA) [5]. Pentru procesarea materialelor au fost utilizate metode operante de evaluare statistică, inclusiv criteriul Student ș.a., precum și facilitățile Windows 2007.

Rezultate și discuții

Preventiv studiului, s-a efectuat analiza clinică și de laborator a bolnavilor. Datele acestei analize nu prezintă diferențe semnificative de vârstă la bolnavii incluși în studiu (tab. 1). După sex, în toate grupurile incluse în studiu prevalează bărbații ($p < 0,05$ pentru I și al II grup, și $p < 0,01$ pentru al III grup). Tratatamentul este de durată mai mare la bolnavii cu reacții toxice (RT) date care, însă, nu pot fi considerate concludente, deoarece nu se confirmă statistic.

Numărul de bolnavi cu eliminări de micobacterii tuberculoase s-a majorat continuu de la primul grup de studiu (1-RA) la al treilea (3-RT), evoluție care, de asemenea, nu poate fi considerată concludentă, deoarece nu prezintă deosebiri

Tabelul 1

Repartizarea bolnavilor conform sexului, vârstei și duratei tratamentului, (M ± m)

Indici	1 - RA	2 - RTA	3 - RT
Vârstă (ani)	36,3 ± 2,38	35,4 ± 2,07	36,0 ± 2,78
Sex: bărbați (num. abs./%)	24 / 64,9 ± 7,85	30 / 61,2 ± 6,96	17 / 70,8 ± 8,75
femei (num. abs./%)	13 / 35,1 ± 7,85•	19 / 38,8 ± 6,96•	7 / 29,2 ± 8,75•
Durata tratamentului, (zile)	74,9 ± 7,76	73,8 ± 5,46	89,5 ± 10,90

Notă: • - deosebire autentică dintre indicii determinați la bărbați și la femei.

autentice (tab. 2). Tabloul clinic este conturat mai clar în cazul bolnavilor cu caverne: comparativ cu grupul reacțiilor toxice, numărul bolnavilor cu caverne s-a înregistrat autentic mai mic în grupul cu reacții alergice ($p < 0,01$) și mai mic – în grupul cu reacții toxico-alergice ($p < 0,05$). Deosebiri autentice dintre primul și al doilea grup nu se determină, deși frecvența identificării cavelor la bolnavii din grupul al doilea este mai mare, decât în primul grup.

Tabelul 2

Repartizarea bolnavilor conform nivelului eliminării de micobacterii tuberculoase – MBT (BK+) și prezența cavelor (CV+), (M ± m)

Indici	1 - RA	2 - RTA	3 - RT
BK+ (num. abs. / %)	26 / 70,3 ± 7,51	40 / 81,6 ± 5,53	20 / 83,3 ± 7,61
CV+ (num. abs. / %)	22 / 59,5 ± 8,07	32 / 65,3 ± 6,80•	21 / 87,5 ± 6,75•

Notă: • – deosebire autentică dintre valorile indicilor în grupurile cu RA și RT.

* – deosebire autentică dintre valorile indicilor în grupurile cu RTA și RT.

Analiza manifestărilor clinice ale efectelor adverse ale preparatelor antituberculoase (tab. 3) demonstrează o frecvență mai mare a pruritului ($p < 0,05$) și erupțiilor cutanate ($p < 0,01$) la bolnavii cu reacții alergice vizavi de bolnavii cu reacții toxice. Comparativ cu bolnavii cu reacții alergice, bolnavii cu reacții toxice au prezentat mai des acuze de greață

și vomă ($p < 0,001$), tot la ei fiind determinată și mărirea ficatului ($p < 0,001$). Bolnavii cu reacții toxico-alergice mai des au prezentat acuze, caracteristice atât pentru reacțiile alergice, cât și pentru cele toxice. Astfel, la acești bolnavi s-a determinat o frecvență mai mare a pruritului ($p < 0,05$) și erupțiilor cutanate ($p < 0,001$) față de bolnavii cu reacții toxice. Acuzele de greață ($p < 0,05$) și vomă ($p < 0,01$) au fost mai rare comparativ cu bolnavii cu reacții toxice, dar mai frecvente decât la bolnavii cu reacții alergice. Mărirea ficatului ($p < 0,01$) s-a determinat mai rar decât la bolnavii cu reacții toxice, dar mai frecvent comparativ cu bolnavii cu reacții alergice.

Analiza testelor de laborator a manifestărilor efectelor adverse ale preparatelor antituberculoase (tab. 4) demonstrează un conținut autentic majorat al eozinofilelor ($p < 0,001$) și limfocitelor ($p < 0,05$) la bolnavii cu reacții alergice, comparativ cu bolnavii cu reacții toxice.

Comparativ cu bolnavii cu reacții alergice, la bolnavii cu reacții toxice, mai frecvent s-a determinat un tablou caracteristic anemiei ($p < 0,05$) și un conținut majorat al ALT și AST ($p < 0,05$). De asemenea, pentru acești bolnavi este caracteristic conținutul majorat al neutrofilelor segmentate ($p < 0,001$) și nesegmentate, precum și frecvența mare a cazurilor de granulații toxice în neutrofile ($p < 0,05$).

Datele de laborator demonstrează valori intermediare ale indicilor studiați la bolnavii cu reacții toxico-alergice față de bolnavii cu reacții alergice și cei cu reacții toxice. Astfel, conținutul neutrofilelor segmentate la aceștia este mai mic decât la bolnavii cu reacții toxice, dar autentic mai mare

Tabelul 3

Manifestări clinice ale efectelor adverse ale preparatelor antituberculoase

Indici	1 - RA	2 - RTA	3 - RT
Maladii alergice în anamneză, (num. abs./%)	2 / 5,4 ± 3,72	2 / 4,1 ± 2,83	1 / 4,2 ± 4,08
Reacții toxice în anamneză, (num. abs./%)	0	0	1 / 4,2 ± 4,08
Prurit la nivel cutanat, (num. abs./%)	5 / 13,5 ± 5,62•	6 / 12,2 ± 4,68*	0
Erupții cutanate, (num. abs./%)	9 / 24,3 ± 7,05•	10 / 20,4 ± 5,76*	0
Parestezii, (num. abs./%)	3 / 8,1 ± 4,49	3 / 6,1 ± 3,42	3 / 12,5 ± 6,75
Greață, vomă, (num. abs./%)	0•	6 / 12,2 ± 4,68•	8 / 33,3 ± 9,62•
Pierderea vederii, (num. abs./%)	0	0	1 / 4,2 ± 4,08
Mărirea ficatului, (num. abs./%)	2 / 5,5 ± 3,72•	15 / 30,6 ± 6,58*	15/62,5 ± 9,88•

Notă: • – deosebire autentică dintre valorile indicilor în grupurile cu RA și RTA;

• – deosebire autentică dintre valorile indicilor în grupurile cu RA și RT;

* – deosebire autentică dintre valorile indicilor în grupurile cu RTA și RT.

Tabelul 4

Manifestări ale efectelor adverse ale preparatelor antituberculoase conform testelor de laborator

Indici	1 - RA	2 - RTA	3 - RT
Anemie, (num. abs. / %)	1 / 2,7 ± 2,67•	3 / 6,1 ± 3,42	5 / 20,8 ± 8,29
ALT •, (num. abs. / %)	4 / 10,8 ± 5,10•	10 / 20,4 ± 5,67	8 / 33,3 ± 9,62
AST •, (num. abs. / %)	2 / 5,4 ± 3,72•	9 / 18,4 ± 5,53	7 / 29,2 ± 9,28
Proba timol •, (num. abs. / %)	1 / 2,7 ± 2,67	2 / 4,1 ± 2,83	1 / 4,2 ± 4,08
N. cu granulații toxice, (num.abs./ %)	0•	1 / 2,0 ± 2,02*	5 / 20,8 ± 8,29
Leucocite, (x10 ⁹ /l)	7,5 ± 0,34	8,4 ± 0,37	9,1 ± 0,75
N. segmentate, (%)	53,7 ± 1,50•	62,3 ± 1,39	64,7 ± 1,90•
N. nesegmentate, (%)	3,6 ± 0,48•	3,7 ± 0,65	5,0 ± 0,94•
Eozinofile, (%)	7,5 ± 0,75•	2,4 ± 0,33*	1,4 ± 0,30•
Limfocite, (%)	28,1 ± 1,50•	24,7 ± 1,36	21,7 ± 2,00

Notă: • – deosebire autentică dintre valorile indicilor în grupurile cu RA și RTA;

• – deosebire autentică dintre valorile indicilor în grupurile cu RA și RT;

* – deosebire autentică dintre valorile indicilor în grupurile cu RTA și RT.

Tabelul 5

Acțiunea *in vitro* a preparatelor BioR și BioR^{Zn} asupra nivelului de expresie a reacției de proliferare a limfocitelor T conform datelor testului TTBL+PHA (M ± m)

Grupul și timpul efectuării testului	Limfocite	Limfocite +RioR	Limfocite +BioR ^{Zn}
1 - RA până după	61,7 ± 1,42 67,8 ± 1,09•	65,6 ± 1,11 67,5 ± 0,64	67,6 ± 0,90 61,9 ± 0,86•
2 - RTA până după	54,9 ± 1,12 61,4 ± 1,17•	59,9 ± 1,04 63,4 ± 0,86•	63,7 ± 0,95 62,1 ± 0,74
3 - RT până după	48,1 ± 2,47 56,3 ± 2,71•	52,9 ± 2,35 58,4 ± 2,20	57,1 ± 2,24 56,3 ± 1,68
	până după	până după	până după
P 1-2	< 0,001 < 0,001	< 0,001 < 0,001	< 0,01
P 1-3	< 0,001 < 0,001	< 0,001 < 0,001	< 0,001 < 0,01
P 2-3	< 0,05	< 0,01 < 0,05	< 0,01 < 0,01

Notă: • – deosebire autentică dintre valorile indicilor în fiecare din grupurile cu RA, RTA și RT până și după administrarea preparatelor.

($p < 0,001$) decât la cei cu reacții alergice. Cazurile de granulații toxice la bolnavii cu reacții toxico-alergice sunt mai rare ($p < 0,05$) decât la bolnavii cu reacții toxice, dar mai frecvente decât la cei cu reacții alergice. Conținutul eozinofilelor este mai mic ($p < 0,001$) decât la bolnavii cu reacții alergice, dar mai mare ($p < 0,05$) decât la cei cu reacții toxice.

Prin urmare, bolnavii cu reacții alergice, toxico-alergice și toxice la preparatele antituberculoase prezintă deosebiri de laborator și clinice clare, care confirmă o evoluție mai gravă a maladiei la bolnavii cu reacții toxice și mai puțin gravă la bolnavii cu reacții alergice.

Analiza acțiunii preparatelor studiate asupra nivelului de expresie a reacției de proliferare a limfocitelor T conform datelor testului TTBL+PHA (tab. 5) prezintă valori mai scăzute ale activității de proliferare la bolnavii cu reacții toxice

și intermediare la cei cu reacții toxico-alergice la preparatele antituberculoase. În toate cazurile studiate, preparatul BioR^{Zn} prezintă o activitate imunomodulatoare mai concentrată asupra limfocitelor T, comparativ cu preparatul BioR.

Prin urmare, datele experimentale confirmă proprietățile imunomodulatoare clare ale preparatului BioR^{Zn}, care reprezintă un complex de principii active: aminoacizi și oligopeptide zinccomponente imunoactive, proprietăți determinate prin implicarea majoră, probabil, a zincului în realizarea acestui mecanism. Se știe că, timulina – hormonul timusului, necesară limfocitelor T este zincdependentă. Perturbările conținutului de zinc, în caz de maladie, influențează negativ asupra proliferării și maturizării limfocitelor T, semnificația zincului în cazul dat asociindu-se cu rolul lui în sinteza ADN și diferențierea celulară [6].

Concluzii

Bolnavii cu reacții alergice, toxico-alergice și toxice la preparatele antituberculoase prezintă deosebiri de laborator și clinice clare, care confirmă o evoluție mai gravă a maladiei la bolnavii cu reacții toxice și mai puțin gravă la cei cu reacții alergice. Preparatele BioR și, în special, BioR^{Zn} prezintă *in vitro* o acțiune imunomodulatoare asupra limfocitelor T. Cu cât este mai scăzut nivelul activității de proliferare a limfocitelor T la bolnavi, cu atât este mai concentrată activitatea imunomodulatoare a preparatului BioR și, în special, a preparatului BioR^{Zn} asupra procesului de proliferare a limfocitelor T și invers.

References

1. Aliev SD, Tagdisi DG, Panakhi MA, et al. Zavisimost vzaimootnoshenii immunobiologicheskoi i allergicheskoi reaktivnosti organizma ot sodержaniya v nem mikroelementov [The relationships dependence

of the immunobiological and allergic reactivity on the content of trace elements]. *Allergologiya i immunologiya*. 2003;4(2):202.

2. Ghinda S, Rudic V, Darii V, et al. Acțiunea preparatului BioR asupra reactivității imunologice și rezistenței naturale la bolnavii cu tuberculoză pulmonară *in vitro* [BioR action on the immunological reactivity and natural resistance in patients with pulmonary tuberculosis *in vitro*]. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe biologice, chimice și agricole*. 2004;3(294):100-107.
3. Girardin-Andreani C. Spiruline: systeme sanguin, systeme immunitaire et cancer. *Phytotherapie*. 2005;4:158-161.
4. Rudic V. Ficobiotehnologie – cercetări fundamentale și realizări practice [Phycobiotechnology – fundamental research and practical achievements]. V. I. Chișinău: Elena, 2007;365.
5. Ghinda SS. Modifikatsiya micrometoda reactii blasttransformatsii limfotsitov [Modification of a micromethod of lymphocytes blast transformation reaction]. *Laboratornoe delo [Laboratory work]*. 1982;2:23-25.
6. Lavrova AE. Biologicheskaya rol tsinka v norme i pri zabolevaniyakh [The biological role of zinc in health and disease]. *Rossiyskii pediatricheskii zhurnal*. 2000;3:42-47.